

## HIGH-CONCENTRATION LIPOSOME PROCESSING METHOD

Publication number: JP1501228T

Publication date: 1989-04-27

Inventor:

Applicant:

Classification:

- International: A61K9/00; A61K9/127; A61K9/00; A61K9/127; IPC1-7: A61K9/10

- European: A61K9/127P

Application number: JP19870506111 19870918

Priority number(s): US19860908785 19860918; US19860909122 19860918

Also published as:

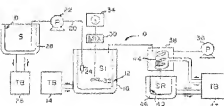
WO8801664 (A1)  
EP0285638 (A1)  
EP0285638 (A4)  
EP0285638 (A0)

Report a data error here

Abstract not available for JP1501228T

Abstract of corresponding document: WO8801864

A method of preparing a concentrated liposome suspension having a lipid concentration of greater than about 250  $\mu\text{m}/\text{ml}$  and liposome sizes no greater than 0.4 microns. A solution of vesicle-forming lipids in a chlorofluorocarbon solvent passing from sealed feed tank (16) through feeder line (20) by pump (22) is injected through nozzle (24) into a sealed solvent infusion chamber (12) containing an aqueous medium, optionally also a water-soluble compound, and maintained at constant temperature and at a pressure of vacuum to about 200 mbar by vacuum pump (36). Extending into chamber (12) is a mixer (30) having a blade (32) and controlled by rheostat (34). Solvent drawn off by pump (38) is condensed in condenser (38) and collected in solvent-recovery tank (40). During the lipid injection and solvent-removal steps, the liposomes formed in the aqueous medium are extruded through a membrane to reduce liposome sizes to less than about 0.6 microns. The lipid injection, solvent-removal and extrusion steps are continued until a lipid concentration of at least about 150  $\mu\text{m}/\text{ml}$  is reached. The liposomes may contain reporters useful in assay (s) or drugs for administration.



Data supplied from the esp@ccnet database - Worldwide

◎ 日本国特許庁 (J P)

◎ 特許出願公表

## ◎ 公表特許公報 (A)

平 1-501228

◎ 公表 平成 1 年 (1989) 4 月 27 日

◎ Int. Cl.<sup>4</sup>  
A 61 K 9/10機記符号  
3 2 7庁内登録番号  
C-7417-4C審査請求 未請求  
予備審査請求 未請求

部門 (区分) 3 (2)

(全 15 頁)

## ◎ 発明の名称 高濃度リボソーム乾燥方法

◎ 特 願 昭 62-506111  
◎ 出 願 昭 62 (1987) 9 月 18 日◎ 特許文出 出 昭 63 (1988) 5 月 18 日  
◎ 特 出 願 PCT/US84/02396  
◎ 国際公開番号 WO 88/01384  
◎ 国際公開日 昭 63 (1988) 3 月 24 日優先権主張 ◎ 1985 年 9 月 18 日 ◎ 米国 (U S) ◎ 908,765  
◎ 1985 年 9 月 18 日 ◎ 米国 (U S) ◎ 908,122

◎ 発 明 者 マーチン、フランク ス ジェ アメリカ合衆国 カリフォルニア 94127 サン フランシスコ、  
イ、 ウェスト ボーデル アズエニユー 415  
◎ 発 明 者 ウェスト 様、ダレン アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070 サン カルロス、コロ  
ナド アズエニユー 36  
◎ 出 願 人 リボソーム テクノロジー、イ アメリカ合衆国 カリフォルニア 94025 メトロ パーク、ハミ  
ンコーボレイナンド ルトン コート 1060  
◎ 代 理 人 弁士 山本 秀 泉  
◎ 指 定 国 A T (広域特許)、A U、B B (広域特許)、C H (広域特許)、D E (広域特許)、F R (広域特許)、G B (広域特  
許)、I T (広域特許)、J P、L U (広域特許)、N L (広域特許)、S E (広域特許)

## ◎ 要 約

1. 懸置濃度が約 250 mg/ml より高くかつリボソームの  
サイズが約 0.5 ミクロンを越えないリボソーム懸濁液を調整  
する方法であって、該方法は、

水和形成性懸濁液をクロロフォルム-カーボン酸に溶解させ、  
段階的加圧処理を形成すること、

該懸濁液を全体の体積で、数分の範囲で大きく遅く遅く  
なるような圧力および温度条件下で、そしてとしてオリゴ  
ヌクレオチドを産生するような注入速度で、水相媒体中に注入する  
こと、

該注入工程の間に、注入されたクロロフォルム-カーボン酸  
媒体を、それが水相媒体中に導入されるものと実質的に同じ速度  
で、該媒体から除去すること、

また、該注入工程の際に、該水相媒体中に形成されたリボ  
ソームを抽出し、最大のリボソームのサイズを約 0.6 ミクロ  
ンを下まわすように減少させること、および

該水相媒体中の懸置濃度が少なくとも約 250 mg/ml 以上と  
なるまで、該導入、除去および抽出を継続すること、

を包含する。  
2. 発明は「フレン11」に約 100 ~ 700 mg/ml の  
濃度で溶解する糖質の範囲第 1 項に記載の方法、

3. 発明は「フレン2」を包含する請求  
の範囲第 2 項に記載の方法、

4. 発明は「フレン3」の範囲第 3 項に記載の方法であ

り、そして高濃度リボソームが、水性媒体 190 mg/ml につき 1 分  
あたり約 0.5 ~ 2 分の注入速度で除去性媒体に  
注入される請求の範囲第 1 項に記載の方法、

5. 高濃度リボソームが、0.1 ~ 0.4 ミクロンの選択された  
サイズのポリカーボネート膜を通して押し出される請求の  
範囲第 1 項に記載の方法、

6. 高濃度リボソームが約 1 ミクロンの該サイズを有するポ  
リカーボネート膜を通して押し出される請求の範囲  
第 1 項に記載の方法、

7. 調整された懸濁液を含有するリボソームを調整  
するのに用いられる請求の範囲第 1 項に記載の方法であって  
所記化合物は脂質媒体に溶解している、

8. 水およびクロロフォルム-カーボンの両者に可溶性の糖  
質を含むクロロフォルム-カーボン酸中に溶解した水溶性化  
合物を含む、リボソームを調整するのに用いられる請求の範  
囲第 1 項に記載の方法であって、該化合物は糖質媒体中に  
溶解して存在している、

9. 前記化合物がプロテオールであり、前記クロロフォルム-  
カーボン酸媒体が、該化合物を溶解中に溶解するもの必  
要とされる容積比のエタノールを含有する請求の範囲第 6 項  
に記載の方法、

10. 少なくとも約 0.1 ミクロンを下まわすサイズのリボソ  
ームを含有しないリボソームを形成するのに用いられる請求の  
範囲第 1 項に記載の方法であって、高濃度懸濁液は糖質媒体

# 特表平1-501228(2)

および水性媒体が連続的に供給される反応器中で形成され、そして移方浴はさらに、前記注入工程の際に該反応器を循環し、主として約 0.1 ミクロンを下まわるサイズのリボソームを含む液相および主として約 0.1 ミクロンを上まわるサイズのリボソームを含む遠心液を形成すること、および該液相液を遠心液中に注入すること、を包含する。

11. 主としてリボソームにカプセル化された帯電の水性塩化合物を含むリボソームの懸濁液を調製する方法であって、該方法は、

小胞形成性脂質をクロロホルム/カーボン酸に溶解させ、溶液中脂質溶液を形成すること、

該脂質溶液を液相の状態で、脂質の濃度が大く濃くされるような圧力条件下で、そして主としてオリゴマー/小胞を生成するような注入速度で、該液相の滴点を越える速度に供給され、カプセル化されるべき化合物が後述の状態で該溶液に溶解している水性媒体中に注入すること、

該注入工程の際に、注入されたクロロホルム/カーボン酸を、それが水性媒体中に導入されるのと実質的に同じ速度で、該液体から除去すること、および

該水性媒体中の脂質濃度が約 150 ~ 400  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  となるまで該注入を継続すること、

を包含する。

12. 前記注入系、前記懸濁液中の脂質濃度が約 150  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  もしくはそれ以上となり、そしてカプセル化効率が高くなる

とら約 80% となったときを終了させる前記懸濁液11項に記載の方法。

13. 主として約 0.1 ミクロンを下まわるサイズを有するリボソームの懸濁液を調製するのに用いられる懸濁液の懸濁液11項に記載の方法であって、該方法はさらに前記注入工程の際にリボソームを抽出することを包含する。

14. 主として約 0.1 ミクロンを下まわるサイズのリボソームを含む液相および主として約 0.1 ミクロンを上まわるサイズのリボソームを含む遠心液を形成すること、および該液相液を遠心液中に注入すること、を包含する。

15. リボソームペーストを懸濁液にするのに用いられる滴下の懸濁液11項に記載の方法であって、該方法はさらに前記懸濁液を液相液によって調製することを含む。

16. 前記小胞形成性脂質が少くとも約 5 モル%の荷電脂質を含む。そして前記注入が、前記水性媒体中の脂質濃度が約 150  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  以上達したとき、リボソームサイズを約 1.5 ミクロンを下まわるように調整することを含むこと、前記の懸濁液11項に記載の方法。

17. 前記荷電脂質がホスファジリド/セロールである懸

## 特 許 書

### 高濃度リボソーム調製方法

#### 1. 発明の分野

本発明は、高カプセル化効率および高脂質濃度により特徴づけられるリボソーム懸濁液を調製するための方法に関する。

#### 2. 背景技術

- Cefano, D. S., *Biochim Biophys Acta* 649:159(1981).  
 Dauner, D., & Blechschlaeger, A. 443:629(1975).  
 Galizano, A., & Cander Research 42:473(1982).  
 Pozniak, M. L., & Phara 30(4):277(1984).  
 Schieren, T., & *Biochim Biophys Acta* 542:137(1979).  
 Stokke, F. Jr., *J. Tree Nat Acad Sci* (1984) 73:4194(1978).  
 Stokke, F. Jr., & *Ann Rev Biophys Biochem* 9:407(1980).

#### 3. 発明の概要

リボソームは実験供給においていくつかの利点を提供し、片断的供給されたとき、細胞内もしくは細胞内の組織のいずれであっても、細胞内における適切な濃度の脂質を供給することにより、リボソームは、長時間にわたるカプセル化された薬剤の制御された「制御的な」放出を提供し、薬剤の調製物を与えることができる。リボソームは治療的に経口投与する方法において、薬剤の組織分布をならびに高効率に提供

させることができ、そして、薬剤投与の頻度を低くすることにより、治療を便利にすることがある。リボソーム薬物候補シスチムはPozanase<sup>®</sup>により試験が実施されている。

吸入法による薬剤供給のためのリボソームの使用もまた有望なものである。そしてそれは呼吸器系による薬物経皮吸収、<sup>1</sup>「リボソーム吸入およびその方法」出願番号第737,221号（1985年5月20日出願）に記載されている。吸入リボソームは、臨床試験により、肺病を有する薬剤が選択された放出速度で放出するように、調整される。その放出速度は、半減期が肺病前から肺の間に変化しうる。さらに、薬剤がリボソーム内に封鎖されている限り、呼吸および肺病中に急変に取り込まれることによる副作用が減少される。

リボソームは、親油性および親水性の薬剤の両方の適合性、および選択された薬剤の放出速度を達成するための経皮吸収を促進する能力はまた、薬剤を局所的に投与することにもしく（呼吸器経路へ投与することに対しては）また有利である。経皮経路へ薬物供給するためのリボソームの付加剤は、肺の上皮細胞層でのリボソームの存在時間を長くするために、リボソーム表面が粘膜への透過性を防止するために改善されることである。この改良は抽出品による特許品である「粘膜組織でのリボソームの保持の促進」出願番号950,515号（1986年7月30日出願）に記載されている。

薬剤を投与したりリボソームを形成するためのいくつかの方法が知られている。ある方法においては、小腸粘膜細胞を、

が提供されている。これらのうちの1つは細胞注入である。この方法においては、溶液が細胞膜（lipid bilayer membrane）が形成する導入されるDeamer, Schieros, Coiro<sup>2</sup>。この方法により、カプセル化細胞（指環型）が約20〜45%と比較的均一な、単一的小胞が生成される。細胞膜がより厚いのは、おそらく比較的小さい膜を穿つための細胞の存在に関連すると考えられる。

カプセル化細胞の最良または、逆相乳化（reverse emulsion method）によるリボソームの複製によって達成される（Zakov, 1978, 1980）。ここでは逆相乳化剤が水性媒体と混合され、そして乳化された油中水型乳剤が形成される。脂質溶液を凍結することにより逆相乳化剤が凝集する。次にそれを、凍結し（水相媒体を抽出し、脂質媒体の存在下で溶解し、逆相小胞（reverse-phase emulsion vesicles）が形成される。このRPEは、比較的小さいサイズで、1から数個の二重膜を有する均一な小胞に分離される。水溶性化合物のカプセル化剤は、典型的には、適切な水性媒体中に溶解した化合物の約50〜60%の間である。

凍結法とRPEの両方において、凍結によるリボソームの複製を可能とするために、および/またはリボソームの複製効率を改善するためには、リボソームのサイズを減少させることは必要である。<sup>3</sup>他の場合においては、リボソームのサイズ調整を行うかカプセル化された物質の損失が起る。リボソームによる薬物供給の利点はリボソームによる薬物

表1-1-501228 (3)

フラストの膜面に近いフィルムとでは溶解せず、そして、水相媒体を加えることにより徐々に溶解する。試験されるべき薬物は脂溶性（親油性薬剤の場合）に、もしくは水溶性（親水性薬剤の場合）のいずれかに適合される。生成するリボソームは、約0.5から10ミクロンの間の不均一サイズの多量（ナノ小胞）である。

このRPEは、典型的には、モジウム（均質化）、超音波処理または膜を用いた抽出によりより均一に処理される。より小さく、より均一化したサイズの脂質膜が生成される。約0.2から0.4ミクロンまでにサイズを小さくしたリボソームが一般に好まれる。このサイズの領域のリボソームは、0.43ミクロンのフィルターを通過させることにより濃縮される。そして、このようなリボソームは溶解する傾向が少なく、かつ細胞内投与を行ったときに細胞へのより好ましい分布を誘導する（Schieros<sup>3</sup>）。

RPEの欠点の1つは、水溶性の薬剤がカプセル化細胞に比較的低いことである。典型的には、小胞が水性薬剤を溶解することにより閉鎖された場合には、脂質フィルムに溶解された薬剤のうち約5〜15%のみが小胞にカプセル化される。またに応じてリボソームのサイズ調整を行うことにより、さらにこれらの薬剤の割合（%）が変化する。なぜならリボソームのサイズ調整により、一般にカプセル化された物質のある程度の損失が起ることである。

より高いカプセル化効率がリボソームを調整する別の方法

の治癒に依存する。主としてリボソームに封鎖された脂質の薬剤（つまり、少なくとも薬物の約50%がリボソームに封鎖されたもの）として投与することが、一般に望ましい。これは、特に、薬剤が細胞の膜で吸収されたときに望まぬ副作用を引き起こすことと無関係である場合においては、そのとおりである。水溶性の薬剤を主としてリボソームの形で投与することの利点は薬物投入による特許品「リボソーム吸入およびその方法」出願番号第737,221号（1985年5月20日出願）に記載されている。ここでは、脂質メタプロチオール（MPT）が主としてリボソームにカプセル化された形で投入されるときに細胞膜の寿命や副作用が大幅に減少することから生じている。

水溶性薬剤の場合には、細胞のリボソーム膜面に近いまたは約50〜60%のカプセル化が達成されている。リボソームに溶解した薬剤を除去する処理を行うことによりより高いカプセル化レベル（カプセル化率が50%を超える）が達成される。これは、一般に、分子間トラップ法（trapping）、遠心分離もしくは透析法（dialysis）によりなされる。これらの方法のすべてにおいて、細胞の運動を含むバルク（bulk phase）の懸濁液は、薬剤を含むバルク媒体（bulk media）によって置換される。

このプロセスの欠点の1つは、細胞の薬剤を経過的に細胞膜に閉じ、および必要に応じて除去された薬剤の再利用が必要であることである。水溶性で、リボソーム透過性の薬剤の場合

接表平 1-501228(4)

[illegible]

#### 6. 全明の特約

本発明の一般的な目的は、生産技術の上記問題点およびリボソーム複製の期間を大きく実用するリボソーム処理方法を提供することにある。

より詳細には、本発明の目的は、水溶性重合体のカプセル

化銀印が少なくとも約50%。そして、70%もしくはそれ以上  
までとなるようなリボソールの消滅率を達成することにある。

本発明の他の目的は、付加的な脱水処理を経わずにペーストもしくは、ペーストに近い形態で存在する凝結されたリゾチーム熱凝固物を調製する方法を提供することにある。

それに關連した目的は、津浦鐵道により容易に破壊され得るそのようなペーストを製造する方法を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、50%を越えるカプセル化を保持しながら、例えば、0.1~0.4ミクロンという狭いサイズ領域のリソソームを製造するのに適当な陽イオン性ポリマーと陰イオン性ポリマーとを組み合わせることにある。

本発明 ある局面においては、主として水溶性化合物を含む（つまり、ポリマーまたはモノマーが水に溶解して50%未満の水相中に含まれる）ポリマーの懸濁液を調整する方法を包含する。本方法を施す主要な場合には、クロロホルム、メタン、ベンゼンを用いた小規模反応性装置が好適で、調整の容易が、大規模に及ぶようである。需要が、バッチ操作である。そして、水相中にポリグッド・C小粒が混入しようとする速度で、水相中に反応物と導入される。カチオン化される。主成分物は水溶性化合物の懸濁液のいずれかに溶解させる。廃水の放出は、大規模装置中の生産速度が約 156-500 g/mol/時である。また、最終の抽出は、抽出した抽出液と水との実質的に同じ速度で発生させる。そして、選別された抽出液に連続して抽出に使用される。

この2つの方法を組み合わせると、資源されなりホソーム  
質価値を製造するのにも有用である。このリガソーム懸濁液は、  
a) リホソームサイズが約 0.4ミクロンを下まわれ、そして、

り、本得度東渡を主としてサマエにされた髪型である。そして、この髪型は、サマエの髪型に於いては、リゾールと整髪剤は、理髪師の人の手によるリゾールの工役の間に使われる。濡れたリゾールが乾くまで待つリゾールが陰乾される。そして、これらのリゾールとは理髪師が、剃刀に注入した潤滑油で潤滑を施される。この剃刀はリゾールの部分より六分の一の重さで設計される。連続的な運動、潤滑、および注入速度による、最終的にリゾールの状態が本発明の利点の1つ（つまり高リゾール潤滑および陰乾潤滑）を特徴とすることになり得る。そしてこれはより小さなリゾールを必要としない。

本発明のこれらのそして他の目的と特徴とは、次の本発明の詳細な説明を添付の図面とあわせて読むことにより、より容易に知られるべきである。

### 四、國語教學的實施

第1図は本発明を実施するのに用いた論理処理システムを  
ダイヤグラムの形で示し、

第2図はリボソーム板製において押出しによりリボソームのサイズを調整するために用いる。第1図のシステムにおける付加的な構成部を示す。

図3は前述の熱源のサイズを有するリボソムの図解に  
 対応するリボソーム処理システムの熱の交換熱源の一部  
 を示す。

第4図はすなわち従って実施された2つの異なる処理方法  
 における温度の図解として次のサブセル化熱源のプロット  
 を示し、そして第5A～第5D図は、温度差 $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{mol}$   
 (4A)、 $100\text{ }^\circ\text{C}/\text{mol}$  (4B)、 $150\text{ }^\circ\text{C}/\text{mol}$  (4C)、お  
 よび $200\text{ }^\circ\text{C}/\text{mol}$  (4D)においてリボソームの運動方法を  
 実装したときに観察したリボソームの運動速度を示す。

#### 温度と圧力制限

##### 1. 温度とセル化制限

###### A. 温度システム

第1図は、本発明の方法により高サブセル化熱源でリボソ  
 ムを処理するのに用いられる熱源システムを示し、これ概  
 10で示される。このシステムは、密封された液体注入器12を  
 含み、この注入器は液体中にいてリボソームが保持される  
 水性液体の貯蔵室を有する。この種の貯蔵室は、小容量  
 処理のための100 mlもしくはそれ以下の容量から、リボソ  
 ムをスケールアップして生産するための100 lもしくはそれ  
 以上の容量の範囲でもあり得る。ここに述べる特定のシステ  
 ムは、単一の様に設計され、およびリボソーム貯蔵室を構成  
 するために設計され、そして、液体注入器は均一の容量を  
 を有する。他のシステムは、より大きな容量の貯蔵室を有

能装置34により制御される。好ましくは1分あたり約400  
 および1500回転の間のブレードの回転を促すように操  
 作される。

容器中の低力は、液体中、再度ポンプ36により約200 ミ  
 パールの真密度に維持される。このポンプは、駆動されるよ  
 うに、冷却剤38により様に駆動される。この冷却剤におい  
 て、ポンプにより駆動された液体が循環する。加熱した液体  
 は液体回収タンク42に流れる。温度調節器44は、加熱さ  
 れた冷却剤を、冷却剤の中心部コイル46およびタン  
 ク48を取り囲む冷却ジャケット48に供給する。

##### B. 熱伝達

図解中図解を参照、タクロロフルオロカーボン溶液に溶解さ  
 せた小形無活性脂質を含む。このタクロフルオロカーボン溶  
 液の組成は、好ましくは室温から下であり、さらに好ましくは  
 約-10°Cの範囲である。ここで定義されている「タクロフル  
 オロカーボン」とは、炭素化、フッ素化された炭素もしくは  
 炭化水素である。上記溶液の特性を降ろ。そして脂質溶液と  
 して用いられるものである。典型的なタクロフルオロカー  
 ボンには、「フレーション11」(CCL<sub>4</sub>)、「フレーション12」(CCl<sub>2</sub>F<sub>2</sub>)、  
 「フレーション21」(CF<sub>3</sub>Cl)、フレーション22」(CFC1<sub>2</sub>F)、  
 「フレーション113」(CCl<sub>2</sub>FCF<sub>3</sub>)、「フレーション114」(CCl<sub>2</sub>F<sub>2</sub>CCl<sub>2</sub>F<sub>2</sub>)、  
 および「フレーション115」(CCl<sub>2</sub>F<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>)が包含される。好まし  
 い例は、トリクロロフルオロメタン(「フレーション11」)で  
 あり、その沸点は1点では23.8°Cである。また、トリクロ

#### 特許1-501228 (5)

せるために、スケールアップもしくはスケールダウンされ得  
 ることは理解されるであろう。

図32は、液体を取り込むジャケット16を介して脂質溶液を  
 14(これは、脂質の温度の水もしくは油の適当な温度を定  
 める)により、液体中特定の温度に保持される。この液体  
 中の液体の内部の脂質の温度は脂質溶液の沸点を過ぎる温度  
 範囲の約67°Cから48°Cの間の温度に保持されるように操  
 作可能である。

図解中図解を参照、液体に溶解した脂質溶液はタンク18か  
 ら供給ライン20および供給ポンプ22を介して液体  
 に注入される。脂質溶液は、好ましくは水性媒体の液体下に  
 に結晶するプロセス44を介して体内に導入される。ポンプ22は、  
 液体中の水性媒体100 mlにつき1分あたり約0.5 ~ 2 ml、  
 好ましくは約1 mlの割合で脂質溶液を注入するように操作さ  
 れ得る。つまり、もし混合液が250 mlの液体溶液を含むと  
 らば、このポンプは、1分あたり約1.4から5.4 ml、好ましく  
 は約2.7 mlの液体を注入するように操作される。

タンクおよび供給ラインの構成は、液体中、温度調節器36  
 により脂質溶液の温度を下まわす温度に調整される。この温度は、  
 冷却剤のより低温にさらされる液体を、供給タンク  
 を取り囲むジャケット38および供給ラインを取り囲むジャ  
 ケット48のクーリング(冷却)により得られる。

液体に溶解するブレード32を含む装置34は、液体中に液体  
 の液体を混合するのに用いられる。このブレードの速度は加

ロフルオロメタンとタクロフルオロメタン(「フレーション21」)  
 との混合物であり、その沸点は1点では6.6°Cである。タ  
 クロロ化される有機物が脂質を形成するために使用される  
 脂質媒体に含有され得る。かつ特定のタクロフルオロカー  
 ボン溶液に溶解しない場合には、溶解は、タクロフル  
 オロカーボンおよび水の混合物に混合し得るエタノールのような  
 溶媒は約10~20% (v/v) まで含有し得る。脂質の注入の速度は  
 れた条件下で所望であるか、もしくは、水相リボソームの  
 熱源中で所望であるかによって決定される。他の量の有効溶媒も  
 また含有され得る。

小形無活性脂質は、リン脂質およびスフィンゴール系に含  
 有する類の小形無活性脂質のうちの選択される。リボソ  
 ムの複製に適用されるリン脂質のリストは、Seela, 1988  
 の411頁に示される。脂質スフィンゴール系(「SFG」)、  
 脂質/コレステロール混合物のより天然の脂質成分が適当  
 であり得る。しかし、本発明により行われる実験においては、  
 スフィンゴール系(「SFG」)のより発現した脂質が  
 約5~10%存在すると、リボソームの形成工程においてより  
 速く、より均一なサイズのリボソームが形成されることが  
 示された。実験例1および2に説明された経路が脂質組成は、  
 55%のSFG、5%のSFG、および40%のコレステ  
 ロールを含む。

さらに、脂質溶液は、オートクレーブのような殺菌  
 装置および/またはリボソームの脂質二重膜中に脂質を



# 特許平1-501228 (ア)

致が通ずることによっても別起ることを得る。それゆゑ、もし細胞が観察された場合および細胞の注入速度が上述した速度よりも低い場合には、細胞が十分に融合されるまでシステム内の実定電圧を減少すべきである。

上述した処理条件下では、形成されりポリソームは、大部分がよりブライドである。すなわち、このポリソームは定に1つまたははものわずかの二重結合を有する。方法の初期段階では、ポリソームは異なるサイズの混合物としており、通常は3クロンを下層のライズから18クロンまたはそれ以上の範囲である。両方とも、融合性的の細胞融合度が50  $\mu\text{mol/l}$ に達したときに形成されるポリソームの典型的な初期段階は観察する。図中に最も大きなより大きなポリソームは約10-15クロンの範囲であり、より小なりポリソームは1.5クロンからまたはそれよりも小さい。カプセル化された生物活性物質のパーセントの決定は、実験例1に記述した方法に従う。50  $\mu\text{mol/l}$ の融合中の細胞ノ量約30-35%の間であることを示す(実験例1)。

本発明の重要な見地は従い水溶液相内への融合の増加を続けること、350  $\mu\text{mol/l}$ の量またはそれより高い濃度でカプセル化された水溶性カーブ(対人費)のパーセントは、最大約60-65パーセントの間のカプセル化に達するまで連続的に増加する。カプセル化効率の一般の上昇は、細胞融合の増加として図1に記述される。図中の上方のカーブ(黒丸)は、実験例1に記述した細胞の実際の1つからプロットしたもので

ある。グラフ中の破線は、50パーセントカプセル化効率に達したときの相定電圧を示す。カプセル化された化合物はアルブセインであり、該アルブセインが比較的小さい水溶性の化合物の例としてであり、ポリソーム形成を促すときに使用される水性の相定電圧に類似する割合がある。

小胞を形成する脂質がPCのように両性両親和成分を含有する場合、脂質と脂質の混合物への連続的な増加は、低濃度中のより大きなポリソームのサイズを徐々に減少させる。この結果は最も右側へ移る図1に見られ、これらの図はそれぞれ100、150、および200  $\mu\text{mol/l}$ でのポリソーム濃度の一連的な段階を示す。100  $\mu\text{mol/l}$ の相定電圧で50  $\mu\text{mol/l}$ の脂質濃度に関して同時にサイズの減少が観察に認められ、

180  $\mu\text{mol/l}$ の脂質濃度ではほとんどすべてのポリソームは約1.5クロンに達するよりも小さい。さらに脂質を増加させて200  $\mu\text{mol/l}$ にすると、ポリソームのサイズ分布は同様に低下する。このように、高いカプセル化効率に加えて、未融合の形態は、約1.5クロンより小なり大きなポリソームサイズの比較的小なりサイズ分布のポリソームを形成する。

(以下省略)

この方法で見られるポリソームサイズの分布や融合速度は、荷電した脂質成分の存在は、実験例1の場合には、1  $\mu\text{mol/l}$ のステアチルグリセロール(卵)の存在に類似していることを示している。以下の実施例および図では、荷電していない脂質、すなわちPCのみ、あるいはPCとコレステロールとを含んだ脂質混合物について述べられている。両方の実施例では、典型的なポリソームサイズは平均であり約0.1とクロンと10クロンの間である。

ポリソームの脂質濃度、相定電圧が約300-400  $\mu\text{mol/l}$ を減り大きくすると徐々に観察される。そして、さらに脂質を増加することには困難であり、不可能となる。濃縮された脂質系はペーセントの相定電圧を有しており、以下の図1で観察されるように、ポリソームペーセント相を利用するいくつかの応用例に適用している。あるいは、出願人が共有している米国特許出願「リソソーム濃縮および方法」、第860,528号(1995年3月7日出版)に記載されている方法に従って、このペーセント相物質をさらに濃縮し、カプセル化効率約70またはそれより高い濃度を得る。

この製造は、無菌の設置および水溶液法を用い、また脂質成分と類似するシステム内の容器を連続的に洗浄する段階によって行うことができる。あるいは、これらポリソームは、法内にて洗浄する前に滅菌処理される。ここでは、これらポリソームは最大サイズが約0.4クロンになるように生じたサイズを小さくしなされる。詳細は

サイズ調整方法では、ポリソームを規定した孔サイズを有する膜に押し押し出す。このような膜には、例えば、0.4クロンの孔サイズを有するポリカーボネート膜(Zeox, 1993)、または非対称なセリックス膜などがある。これらの方法については、出願人が共有している米国特許出願「リソソーム濃縮方法」、第829,710号(1992年2月26日出版)に記載されており、また以下でより詳細に説明する。

実験例1では、100-350  $\mu\text{mol/l}$ の間の多くの脂質濃度のうちの1つを有するポリソーム濃縮に適用されるように、ポリカーボネート膜による押し出しに用いて述べられている。該実施例におけるように、押し出した後のいくつかの調整のステップについて規定したカプセル化率が示されている。表1(実施例1)におけるカプセル化率に示されている。このデータとを比較すると、カプセル化された物質は押し出し工程により失われている。これは、おそらく押し出し中に小さな小胞が破壊され、より小さな小胞を形成するものである。最大脂質濃度が約350  $\mu\text{mol/l}$ の場合には、この方法で達成し得る最高のカプセル化率は約65%である。従って、ポリソーム濃縮法とそれに伴う押し出しの組合せは、ポリソーム濃度が約350  $\mu\text{mol/l}$ に到達させ、カプセル化効率が約65%より高く低下させる。これらの制約は以下に記載される所定濃度により軽減される。

実験例1では、カプセル化を高い効率でカプセル化したポリソームの製造方法の有用性について述べられている。カプセル化は、もともと水溶液状態で含まれる水溶性のポリ



特藏平1-501228 (8)

ソーム導遺伝性化合物の代表例である。カルシウム含有リポソームは、「フラスコ11」に溶解した赤血細胞膜のホホ油、カルシウムの水溶液に、最終調整濃度が約  $300 \mu\text{mol/l}$  程度になるまで仕入る。最終的に、実験例で述べられているように、この方法によるカプセル化効率60%を超えた。非均質電置換法を使用したもので、上で示したように、最終のミセルサイズは約100nm程度までの範囲であった。

高品質なプロ・アマノールを主力として、プロ・アマノールを調製する方法の有用性に比べて近付いてきた。プロ・アマノールは、もともと性質類似に含有する有機性塩基は「フロン」[1]：エーテル、10：1 (v/v) に希釈したに赤いプロ・アマノールの有機性塩基性試薬に加入することにより観察された。クロマトグラフによる分離「フロン」[1]と「フロン」2[2]とによって区別した中に両者を分離させた場合には、脂質類似物にエタノールが存在する必要がある。プロ・アマノールは自然存在物質であるが、脂質試薬をプロ・アマノールの水溶液に加入したときにカリウムを溶解する試料は塩化ナトリウム。これは明らかに、プロ・アマノールが脂質類似物として作用し、リソソーム膜中に存在する脂質類似物にリソソームを溶解させるのである。

注入工程は、最終固着濃度が約  $300 \mu\text{mol/l}$  になるまで進行した。このような最終固着濃度では、約75%の薬剤が、形成されたリポソーム中に包摂化された。生体細胞内には

右図例のように、非荷電脂質成分も含まれているが、リポソームサイズは不均一であり、約10ミクロンまでのサイズが存在する。「フレーション」経路を排除した後のリポソーム発露液中に存在しないエタノールは、必要に応じて追加分、分子標的のマトリクスなどにより除去し得る。しかし、懸濁液中にエタノールが存在することはより、リポソームが安定化したり、カプセル化効率や減少しやすくなることは明らかではない。

## 1. 選擇底盤

## A. 紙理士スチムルにより誘成される

高濃度では、間接的に約 200 mg/l/日を超え、そして約 500 mg/l/日までの暴露濃度と、約 1.5 ミクロンを下回るポリプロピレンとを含有するポリプロピレン熱硬化性樹脂による形跡が認められている。この方向によれば、6.6 ミクロンのフィルターを通して線画することにより容易に検出された高濃度のポリプロピレン熱硬化性が直接検出され、水溶性化合物の存在下で酸化した場合、ポリプロピレンは 50-80 割までのオキシ化比率を有する。

高度医療を供給するために使用するシステム10を産産したもの  
の第2図に示す。改良されたシステムは、第2図において  
は一般に46で表され、第1図に示したシステム10のすべての  
構成要素を割合としている。これらの構成要素には、第2図に示

子と保護親との強制的な関係は、ライズ・フィルター・制約のタイプ)のものを利用することができる。サボロームのサイズ調整を強制的に行うには、この種のフィルターを適用することは、上記の系図体例が示した「サボローム弾道法」に記載されている。この免罪の要素は非常に単純で、ミクロンとよりミックスフィルターを必要としない外れへ送達させる。サボロームは、この源を能に1間または数回通過させるだけで約0.1ミクロン以下の必要サイズにまで小さくされるということが見い出された。

セウミック流説説者は、以下のような原因により本流羽において利益を有する：a) 高い排出圧力を得ることにより、流速速度を高めることができる；b) 静脈のフルターナードリッジを用いることができる；c) かなり大きな容量スケールアップした操作で取り扱うことができる；d) 周期的に逆方向に（外側から内側へ）搬送を促進することにより、閉鎖目標までを押し進めることができる；そして、e) この装置は、その極めて高速度または化学処理による腐蝕を受けることができる。

高濃度処理法は、第1期に述べたラジカル法において用いられるような溶媒と金属および水性媒体成分を使用する。ラジソームにラジアル化および水溶性の金属化合物を含含有するものが、必ずしも含有する必要はない。すなわち、ラジソームは親油性化合物と好ましくは疎水性中脂質溶液に含有されている。またはそのラジアル化された水溶性化合物のいずれか。あるいはその両方を含有する混合物と組成される。

すように、混合色12、水消フタケ16、および混合色ブレード32が与えられる。このシステムは、さらにリザードン2号を添加することによって色調(ishue)も与えられる。管理用リザードンは、パール50、ローズ02、およびビニライン押出機装置54が与えられる。実際は、許すくは1分間あたり混合物の全重量の少なくとも約5〜10%の割合で、混合室内の懸濁液を撹拌するよう必要材料とする。すなわち、乾燥室内、少なくとも10〜20分程度に、混合物の全重量に相当する熱容量を記録するように設計される。ローズは、許すくは乾燥上または研磨レベルにおいて、密度が約1000kg/m<sup>3</sup>以上で、粒径が50μm以下に設計される。

このシステムに対するある実施形態では、吐出し装置は、第1と第2で示される形式であって、 $0.5 \sim 0.6$  ミクロンの孔サイズを有するポリカーボネートフィルムを備えた押出造粒装置である。この方法はマイクロの最大孔サイズに依りポリソームをサイズ調整するのに効果的である。このような孔サイズは、 $0.5$  ミクロン $\sim 2$  ミクロンまたはそれ以上までの孔サイズから選択することが出来る。

別の複雑な経路では、押出し装置は、一連の同心状セラミック層から構成される腔の非対称セラミックフィッティングである。この同心状セラミック層は、内部の環状空間から外部の環状空間へ進むに従って、セラミックの目が密になるものから緩いものに硬化している。この層のタイプは、Vertec Catサンジエス、CA) からカトリッジの形で提供されている。これらフィッティングは、より大規模な、またはより小さな寸法のもの

特表平1-501228(9)

### 四、处理程序

[illegible]

其半に塩類になり、高い揮発性圧力を印加しても約200 g/mol以下の分子量を越えるものは無いと述べている。

高純度Vでは、以下のような特性を有するポリマーを溶解して溶液を調製する方が問題に対して差を伴っている。a) 炭素数約400のポリマー(b)より高純度のポリマー(c)より2.5倍を含有する(そしてc)濃度が低く非線形性加算のポリマーは約50%の含有量)。炭素数1,2及び3のポリマーに対して、低炭素数非活性ポリマーの加算が加算を促進するために、炭素数約400のポリマーを添加する。カブセル化のデータは、炭素数Vの値を示した図4に図3に示されている(左)。明らかに押し出し工程は、溶解と炭素数減少は同じ程度であったとしても、ポリマーの分子量を低下させる。しかしながら、この方法は明白な異質性を伴わずに、50%以上のカブセル化を達成する。第2段階では問題も非活性のポリマー、炭素数のカブセル化(ポリマーと炭素数化合物に対して)、第1段階で述べたような排水工程を付与することにより悪化しない。

## 图 1 第一卷中《天淵閣藏書》

この種では、0.08ミクロンより大きく、好ましくは0.1ミクロンと、1.0ミクロンを下回る選択されたサイズ。例えば0.4ミクロンとの間のサイズ範囲内に主として存在するリガソールの懸濁液を製造するためのシステムおよび方法について述べる。この方法を、単一相および二相種で述べた方法の

一方または両方と組合せの場合には、この整面法は高いカプセル化効率および／または高い品質濃度により特徴付けることができ。

## 人、経理システム

第3図には、本発明のこのような装置に従って第一なサイズのリネソームを製造するために設計されたシステム60を示す。簡単にするために、このシステムは、図に表れずに示した4つの階層的なサブシステムへ分けて述べられてゐる。これらのサブシステムは以下のことを行うために設計した：（Ⅰ）換熱器と溶媒中飽和浴槽との混合；（Ⅱ）溶液の注入および混合；（Ⅲ）サイズを縮小する循環；および（Ⅳ）最終濃縮および濃縮。

陶磁学会サマサウム(Ⅰ)は、一列の材料結合タンク60  
 および60を空にする。これら材料結合タンクは、それぞれ溶  
 融の物質材料および材料結合を供給するに使用される。  
 両方のタンクは連続した物質流を生成するにたいして、タン  
 ク間の空気を防止し、システムを閉鎖し不燃性雰囲気とする。  
 溶融中の物質溶液は、材料タンク68を用いてタンク60から出  
 流66へ流入する。液体は流路72で混合槽へ供給する。こ  
 の流れはパイプ76で閉鎖される。これら2つのタンク、混  
 合槽、およびタンク60を密封してあるラインは、図示  
 されているような適当なタンクシグナメントおよび物質の熱処  
 理にたいして、配管設備の境界点での温度に保たれている。

海に侵入サブシステム（Ⅱ）は、軸ジヤケットに設置された真空室77を密封する。修真空室は、熱ジヤケットで保護された熱伝導材78を経て真空室に接続されている。この真空室は、新質と融着新質とが互を極から真空へ透過するにつれて、それらを阻害する断熱を有し、そして混合した融着物を、摩阻バルブ79を通じてより高純度の真空に徐々に供給する。図から明らかなように、低純度のジヤケットで覆われて保護している加熱された液体は、真空中の物質と環境混合物を、真空室に注入する前に、防汚壁の保護層上に堆積する。真空室は、真空室77により、真空された圧力に減圧される。

・機72はドレーン76を経て蒸気ポンプ78に接続されている。  
 蒸気ポンプ78は、槽中に含まれる液体を隔りたループをまわして連続的に汽液分離する機能がある。この閉じたまループには、三方の接続点を有するバルブ80、通気口、および凝縮液出口が設けられる。明らかなように、蒸気路は凝縮槽の下流にある凝縮液は物質を供給する。蒸気の下流末端部分には、熱ジャケットに接続されており、凝縮後の供給物質を貯蔵槽14の底部に供給する。

サイズ牌小サブシステム(註)は、上述した形式のポリカーボネートフィルターやセラミックフィルターのようなフィルター構造を有する。該フィルターは、選択されたサイズ範囲、好ましくは約1~5ミクロン以下にポリソームのサイズを縮小するのに効果的である。物質は、バルブ6から該フ



て、通達の流れを透過経通フィルターからドレインの方へ向かいます。また、バルブ6を開放して、過剰流量により除去されるものと同等量の残した液体をタンク94に供給する。無目的な漏洩の低付損益は、新しい観測値を加えたいようなバルブ6を開くこと以外は、透過経通の間に用いられる手順に似る。タンク94内の液体は、流量が透過経通フィルターにより除去されるにつれて、次第に濃縮される。リボソーム濃縮度が所望の濃度に進ずれば、この工程は終了する。

#### 4. 用途

##### 4.1. リボソーム抽出

リボソームを生成したある細胞培養は、関心のある成分物の回収に応じて条件が変化するとリボソームの濃縮に際している。検査に用いられるリボソームは、関心のある成分物に適合する。用いた細胞をさらに選択される表面結合剤と、カプセル化されたレポータ（例えば、蛍光部、免疫阻害剤）とを含有する。選択したリボソームからのカプセル化されたレポータの抽出を調整することにより、反応結果における成分物の濃度を決定し得る。

ここに述べた方法は、この種の分離に適したリボソームの濃縮における2つの重要な利点をもたらす。第1に、濃縮されたリボソームは、並列して無ラメラリボソームおよびポリグメラリボソームであり、それゆえ多量ラメラリボソームよりも溶解に対して高効率を有する。第2に、特にカプセル化されたレポータが誘発される場合には、一般時に解凍等低

濃縮することのない条件下、誘発をほとんど損失させることなく、リボソームを増強することができる。

##### 4.2. 非特異的阻害

サイズが500、1ミクロンより小さく、薬剤が充分にカプセル化されたリボソームは、細胞内または細胞内細胞のいづれかにより薬剤を非特異的に取り込むのリスクが低い。本発明は、この種のリボソームと細胞を調製する単純で効果的な方法を提議する。特に、永続的な細胞に対して、サイズ調整していないリボソームの場合には約75%まで、同時にサイズ調整したリボソームの場合には約65%までのカプセル化率を、さらにサイズ調整や阻害剤をさらに濃縮する。カプセル化効率が低いということは、カプセル化されていない物質の濃度が比較的小なく、細胞物の回収率が改善されるかあるいは破壊されるため、ペプチドまたはタンパク質をカプセル化したリボソームを形成するの間に有利である。

高濃度でサイズ調整されたリボソームを製造する能力は、必ずしも細胞の用途においては、さらに有利であるかもしれない。その一例は、患者人が具有している遺伝的疾患「放出を制御されたリボソーム（新稿）、第29,153号（1986年2月10日公開）に開示されているような、肝臓細胞から放出される制御された薬剤に対するリボソームの使用である。このシステムは、従来時に比べ、投与したリボソームからのカプセル化された薬剤の放出が、この細胞に注入されたリボソーム濃度を増加させることにより調節して増加させること

いう原理に基づいている。本発明により調節された高濃度の細胞が、細胞膜による破壊よりも短い時間か長いという可能性を有することは理由である。

##### 4.3. リボソーム吸入

吸入経路による薬剤の投与に利用するリボソームベースおよび高カプセル化細胞の使用は、上記の非特異的放出「リボソーム吸入およびシステム」に述べられている。簡潔には、薬剤は、薬剤が求電性でありリボソーム濃縮度である（例えば、カプセル化された永続阻害剤とバルブの非阻害剤との間で薬剤が平衡に達する）ようなペースト組成物は、リボソームに対して理想的な物理形態を提供する。本発明は、このようペーストを直接吸入するか、あるいはさらに水を加えてとどめを食することによって形成する簡便な手段を提供する。吸入後すぐに、このペーストは、好ましくは約15-30分間まで静置され、そして薬剤は溶解する。薬剤が溶解に遅延する前に、吸入に適した形態で提供される。

あるいは、個人人が具有している上記の遺伝的疾患に罹患しているように、これらリボソームは特定の遺伝性手段で授けられる。ここでは、リボソームは既知型（例えば、マンシトリンソルビドールなど）の存在下で調整し、選択することにより阻害性、そして遺伝的授けることにより遺伝性授けに似る。これら授け、細胞内で複製するか、あるいは破壊のためのクロマトグラフカパーソン濃縮に懸念することがある。非抽出における高カプセル化法の利点、(1)高濃度

度が短縮されること、(2)低濃度経路の単純化にリボソームがほとんど損傷を受けないこと、そして低付損益率を助長よくカプセル化し得ることである。

##### 4.4. 場所的用途および調製に対する使用

本発明により製造し得るリボソームベース組成物は、局所的に適用する薬液やクリームとして、さらに効果することなく、喝いたのどに塗している。局所的に用いた場合、リボソームは、場所的に適用する種々の薬剤（例えば、免疫抑制剤または免疫阻害剤、およびステロイド）を制御して放出することができ、また局所に感染を減らす強固な作用をする。

局所に用いる場合には、ペースト組成物は、この物質が高濃度を有する大の組織の表面においてより効果よく提供されるという利点と、カプセル化された薬剤の割合が高いたる薬剤を制御して放出し得るという利点とを提供する。

以下の実施例は、本発明の種々の実施態様を開示するものである。その範囲を限定するものではない。

(以下省略)

## 第 6 表 平 1-501228 (12)

## 基礎物 1

## リボソーム理論上を定むる25.5%の抽出

ホスファタジルコリン (PC) はアサセ リピッド (Asahi Lipids) (日本) より、コレステロール (CH) はシグマ ケミカル社 (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO) より得た。そして、ホスファタジルグリセロール (PG) はアバンティ リピッド (Avanti Lipids; Birmingham, AL) より得た。

PC (55% リポソーム)、コレステロール (15% リポソーム)、および PG (5% リポソーム) を 270 m のフレイグに溶解し、最終リボソーム濃度が 500  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  にした。10mM トリス-HCl, pH 7.6 の 10% カルボキシルオキシレン (CS) 溶液を、最終濃度が 270 mM となるように調整した。

第 1 図に示し、1 A 箱で上述した処理システムをリボソームの調整に用いたが、オンライン検査法は用いなかった。脂質中間体溶液 (270 mM) を待機待機タンクに入れた、高圧調節後に循環させる方法により 4 分で平衡化した。CP の水溶液 (270 mM) を水相タンクに入れ、20 分に平衡化した。

脂質濃度は、流速 2.7 ml/分 で水相タンクに投入した。すなわち、水相タンク中の脂質濃度割合を約 50% 調整/分にセッティングし、1 ml/分/100 mM 水性溶液で投入した。タンクを減圧 (約 200 mbar) に保ち、減圧により残った溶液を蒸発し、最終目標タンクに入れた。タンク中の減圧の量は徐々に平衡に達した。脂質投入の測定値は、水相タンク中のリボソーム懸濁液の一度量、(a) 脂質濃度、(b) リボソーム

イオン濃度、および (c) カプセル化効率について分析するために採取した。脂質濃度割合、リボソーム懸濁液からの抽出された脂質濃度が 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, および 400  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  に相当する濃度で採取した。すなわち、脂質投入工場の約 13.5 分後に採取した。

試料の脂質濃度は Bartlett の方法により測定した。リボソームのサイズおよびサイズ分布は電子顕微鏡像から決定した。脂質濃度を決定し、保率を算出した。そして計算するためのカプセル化効率に用いた。カプセル化効率を決定するために試料を遠心によりベレットとし、遠心分離後の溶液になるように卵を完全に取り除く。リボソームベレットを調整した。再懸濁したリボソームは 10 分トリトン X-100 を添加して可溶化し、脂質濃度 450 mM より高光束長 650 nm における発光の測定により貯蔵量を決定した。最初の水性溶液中の貯蔵量は、トリトン X-100 で溶液に溶解した後に調整された。カプセル化のパーセントは、リボソームベレット中の CP/元の溶液中の CP の比から決定した。

以下の表 1 は、3 つの異なる試験から得た典型的な結果を示す。第 1 の試験では、表 1 に示すように、55 から 200  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  の間の脂質濃度に相当する時間でリボソーム試料を採取した。Bartlett 分析から決定した実際の脂質は中央の値に示す。カプセル化効率は脂質の割合に依存し、脂質濃度が増加するにつれて低い脂質濃度は、恐らくリボソーム自身の基本体積の制限による。表 1 に見られるように、約 50 パーセントを上回

るカプセル化効率は、約 150  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  以上の脂質濃度で達成される。

試料 (脂質, $\mu\text{mol}/\text{ml}$ )	脂質の割合 (脂質, $\mu\text{mol}/\text{ml}$ )	カプセル化 (貯蔵, $\mu\text{mol}/\text{ml}$ )
25	12.56	30.51
50	25.12	24.26
100	112.78	47.89
150	181.47	57.73
200	191.40	57.81
100	97.20	32.50
200	171.54	55.13
300	251.86	55.18
400	329.80	61.61
250	253.76	68.16
350	335.99	67.33
100	125.79	49.79
250	187.27	51.64
300	189.00	53.91
350	241.83	61.26
400	257.72	65.20

50, 100, 150, および 200  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  の試料濃度でリボソームの脂質濃度を表 1 A - 4 図に示す。50  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  では、リボソームはミクロンを下回るサイズから 10 ミクロンまたはそれより大きいサイズ範囲に分布し、増大は分散している。100  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  では、より大きなリボソームの、約 1.5 ミクロンまたはそれより大きいより均一なサイズの分布が見られる。150 および 200  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  では、脂質濃度は約 1.5 ミクロンより大きいサイズのリボソームを実質的に含有しない。

第 2 の試験では、脂質濃度を 100-400  $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 、すなわち全ての脂質中間体溶液水性溶液に投入することにより過

剰される最も高い濃度でのカプセル化効率を調べた。最初の脂質濃度で脂質濃度は、さらに脂質材料の投入を制限するベレットのようなコンシステンシーを有した。脂質濃度により、脂質濃度をさらに増大させるとカプセル化効率は約 65% 効率にまで増大する。

第 3 の試験は、200-400  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  の間の脂質濃度について表 1 図の下方に示しており、脂質濃度の一様である。

(以下空白)

表 1-501228 (18)

## 実験例 1

## 炭素化人便のリゾソームのサイズ調整

カプセル化されたCFを含むリゾソームの懸濁液は、Nuclease Corp. (Framingham, CA) の 0.4ミクロンのポリカーボネート膜を通して押出すことによりサイズ調整された。このリゾソームは押出し厚が200 $\mu$ mで押し出された。押し出す際の最大圧力調整値は350  $\mu$ mol/cm<sup>2</sup>であり、そのような濃度においては、炭素の押出速度は極めて遅かった。押出後の粒子径はNicom LaserParticle Sizer, 260 型(Nicom Corp., Goleta, CA)のラタックス粒子を用いて検定)により確認された。これらの懸濁液においては、主として0.1~0.4ミクロンと範囲の粒子径を有した。

押出されたリゾソームのカプセル化率は、上記のようにして測定された。つまり、リゾソームをベレット化し、CFを含むしない懸濁液に再懸濁させ、そして、リゾソーム中のCF濃度をもとの水性懸濁液中のそれとを比較することにより決定された。

その結果を下記の表2に示す。押出しの前と後のカプセル化率(カプセル化率)および(カプセル化率)を比較すると、次のことが示された。つまり、懸濁液が両面液の場合には、最終カプセル化率約46%とそれ以上の値が得られるにもかかわらず、最終カプセル化率カプセル化率を有しているCFの富集率は押出しにより失われることが示された。

しない懸濁液で1:10、1:20、または1:40に希釈し、ポルテックスにかけ、リゾソームの均一な分散を得た。材料移動量の追跡結果(下記の表3)の2種の調整値について示される)により、上記3種の希釈物の各々において、カプセル化物質が実質的に100%回収されることが示される。

希釈された試料を高速で遠心分離してリゾソームをベレット化し、そして、該ベレット中の脂肪性成分を測定し、試料中に含有される脂肪性成分と比較した。2つの値はカプセル化のカプセル化率の割合(%)を算出するのに用いた。その結果を2種の調整物のそれぞれについて表3に示す。表3から、各調整物において測定したカプセル化率の平均値(%)は約98%と推定されることがわかる。

表 3

調整物1 回収率(%)	1:10 102.29	1:20 97.80	1:40 98.09
カプセル化率(%)	92.13	94.28	98.43
調整物2 回収率(%)	97.75	105.48	95.18
カプセル化率(%)	91.65	99.10	93.12

調整物のリゾソームのサイズ分布は懸濁液に異なって分散した状態であり、サイズ範囲は約0.1から10.0ミクロンを示す。この結果により、調整懸濁液成分が存在し方によって押出し調整されるリゾソームのサイズ平均値の調整が示される。これとは逆に、調整例1のように両面調整成分が使用された場合には、最大リゾソームサイズは1.5ミクロンが期待

## 表 2

試料 (mg)	カプセル化 (mg)	カプセル化 (%)
100	85.48	22.05
200	159.16	27.72
300	222.59	27.62
366	155.14	20.06
100	52.33	0.28
200	110.15	8.50
250	143.93	18.96
300	168.24	33.65
350	202.82	44.53

## 実験例 2

## カプセル化カプセル化リゾソーム

一部加水分解ダイズホフコリソール(PHPC)はEver-jcan Locithin(Sigma, St. Louis, MO)から、そしてカプセルコーラ(CS)はマイグロコプセル(メー-T)はSigma Chemical Co. (St. Louis, MO) から入手した。

PHPC(77%純度)、カプセルコーラ(33%純度)およびメー-T(1セル純度)を「フロン」50mlに溶解させた。脂質の最終濃度は約300  $\mu$ mol/mlとされた。この系を水性懸濁液、100%調整液(カプセル化率)200  $\mu$ mol/mlの調整液(カプセル化率)4  $\mu$ mol/mlと調整液50mlであった。

調整液を調整し、調整例1に調整したのと同じ様に、脂質濃度を水相タンク中に約0.5ml/分(例えば、1 ml/分/水性懸濁液100 ml)の速度で注入することにより行われた。この処理の前後における懸濁液中のリゾソーム濃度は280  $\mu$ mol/mlであった。最終的に得られる懸濁液の一部を、製品を含有

きた。

## 実験例 3

## カプセル化カプセル化リゾソーム

PC(真純度1)およびPHPC(真純度1)を「フロン」50mlに溶解させた。脂質の最終濃度は約300  $\mu$ mol/mlとされた。この系を水性懸濁液、100%調整液(カプセル化率)200  $\mu$ mol/mlと調整液50mlであった。

調整液を調整し、調整例1に調整したのと同じ様に、脂質濃度を水相タンク中に約0.5ml/分(例えば、1 ml/分/水性懸濁液100 ml)の速度で注入することにより行われた。この処理の前後における懸濁液中のリゾソーム濃度は280  $\mu$ mol/mlであった。最終的に得られる懸濁液の一部を、調整液で1:5に希釈し、ポルテックスにかけ、リゾソームの均一な分散を得た。希釈された試料を高速で遠心分離してリゾソームをベレット化し、そして、ベレット中の脂肪性成分を測定し、試料中に含有される脂肪性成分と比較した。材料全体に対するカプセル化率の割合は約75%であった。

## 実験例 4

## 炭素化人便のリゾソームの調整

調整例1に同じ。次の(1)および(2)の調整を行って、リゾソーム濃度を調整した(1)調整液(脂質濃度)500  $\mu$ mol/mlを含有した。および(2)調整液(脂質濃度)500  $\mu$ mol/mlを含有した。

図表 1-561228 (14)

図 1 図に示すシステムのフィルダー抽出ラインを通して循環させた。このラインは、海産ロジ、および包囲された膜チャンパー（ここには、0.4ミクロンのポリマーポルトフィルダーが取り付けられている）を有する。透過液の上流側の腔を物 341 に負す。膜の最初の最後において透過液は、モノ分を有するようにした。

サイズ膜を同時に待たない溶媒注入方法とは異なり、最も高い膜濃度（約 500  $\mu\text{mol}/\text{ml}$ ）でさえもリソソーム懸液は充分に粘性であるため、さらに引き続いて注入を行うことが可能である。この方法によれば、抽出が行われた後に溶剤注入により、リソソーム凝集が行われる場合には、より高濃度（例えば、500  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  対 350  $\mu\text{mol}/\text{ml}$ ）の膜懸液の抽出が可能である。

種々の濃度におけるリソソーム物質のカプセル化効率を表 4 に示す。このデータにより、約 0.4 ミクロン半径を有するサイズ、および約 35% を超えるカプセル化効率、を有する高濃度の調製物がこの方法により直接調製されることが示される。

表 4

膜 濃 ( $\mu\text{mol}/\text{ml}$ )	0.4 $\mu\text{m}$ FL (抽出 $\mu\text{mol}$ )	カプセル化 (%) (F/F <sub>0</sub> )
100	57.92	17.62
200	101.42	19.69
250	156.71	24.62
300	171.85	24.62
350	210.00	31.72
400	232.87	45.84
500	359.58	55.95

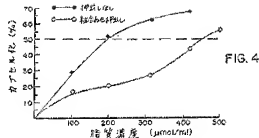
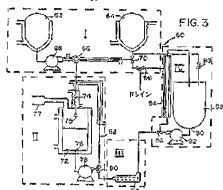
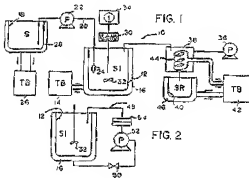


FIG. 5A



FIG. 5B



FIG. 5C



FIG. 5D

